| Universidad del Valle | UNIVERSIDAD DEL VALLE<br>DEPARTAMENTO DE QUÍMICA | NORMA LQO–05<br><br>FECHA D/M/A<br>19/01/08 |
|---|---|---|
| LABORATORIO DE QUÍMICA ORGÁNICA | | PREPARADO POR:<br>Braulio Insuasty Obando y Arnoldo Ramírez Barco |
| CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA Y COLUMNA | | REVISADO POR: Rodrigo Abonia G. |

## OBJETIVOS

- Identificar la técnica cromatográfica como una herramienta fundamental para el seguimiento de reacciones químicas y separación de mezclas.

- Establecer diferencias entre las distintas técnicas cromatográficas utilizadas para la purificación de sustancias orgánicas.

## INTRODUCCIÓN

La **cromatografía de capa delgada** (CCD) es uno de los métodos más ampliamente utilizados para el seguimiento de reacciones químicas, identificar y en muchos casos, para separar cualitativamente mezclas de sustancias químicas.

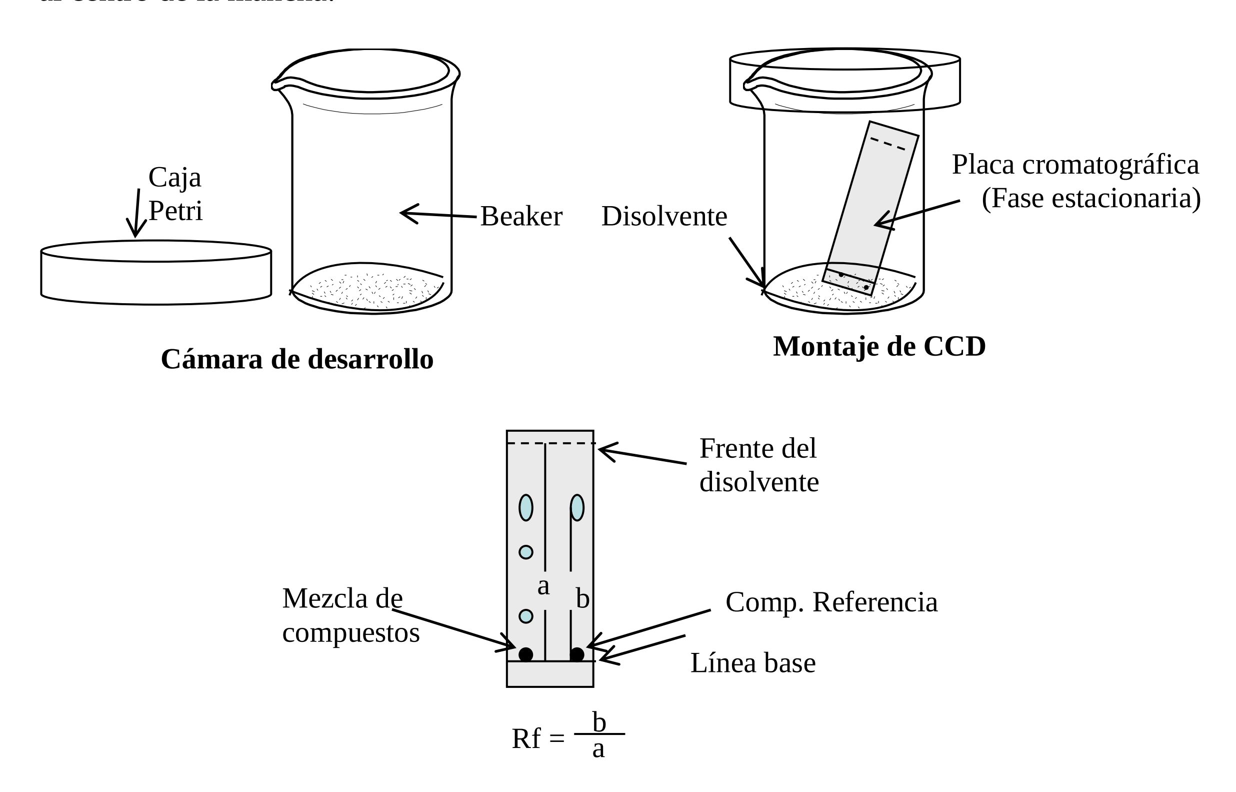
En principio, la CCD es muy sencilla. Se genera una capa uniforme de adsorbente sólido adecuado (fase estacionaria) sostenida sobre una placa de vidrio o de aluminio. Se coloca con un capilar en el origen de la placa una mancha de una solución de un compuesto orgánico (o mezcla) en estudio, se deja que un disolvente adecuado (eluyente o fase móvil) ascienda por la capa del adsorbente por capilaridad. Si la mancha del compuesto (o compuestos) separados son coloreados, se pueden identificar de manera visual directamente en la placa. En caso de que no lo sean, se deben identificar con la ayuda de un indicador/revelador, o con luz ultravioleta si la fase estacionaria contiene un indicador ultravioleta (químicamente inerte) el cual produce fluorescencia al irradiarse con luz UV de onda corta (254 nm) u onda larga (366 nm) dependiendo del tipo de indicador utilizado.

Los compuestos ascienden por la capa del adsorbente a diferentes velocidades con relación al eluyente realizándose de esta forma la separación de los compuestos de la mezcla. A veces es posible identificar los componentes de la mezcla midiendo la velocidad relativa de cada uno de ellos con relación a la velocidad del frente del solvente (fase móvil).

Esta movilidad relativa se conoce como el valor del $R_f$ del compuesto y se define por:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

El valor de $R_f$ es una constante de cada compuesto bajo un conjunto de condiciones definidas (eluyente, fase estacionaria, temperatura, espesor del adsorbente y humedad). Los valores de $R_f$ se encuentran en el rango de 0 a 0.999. Donde la distancia es medida al centro de la mancha.




**Cromatografía de columna** (CC), es uno de los métodos más efectivos utilizados para la separación cuantitativa de compuestos orgánicos, especialmente cuando otros métodos de separación más comunes han resultado poco efectivos.

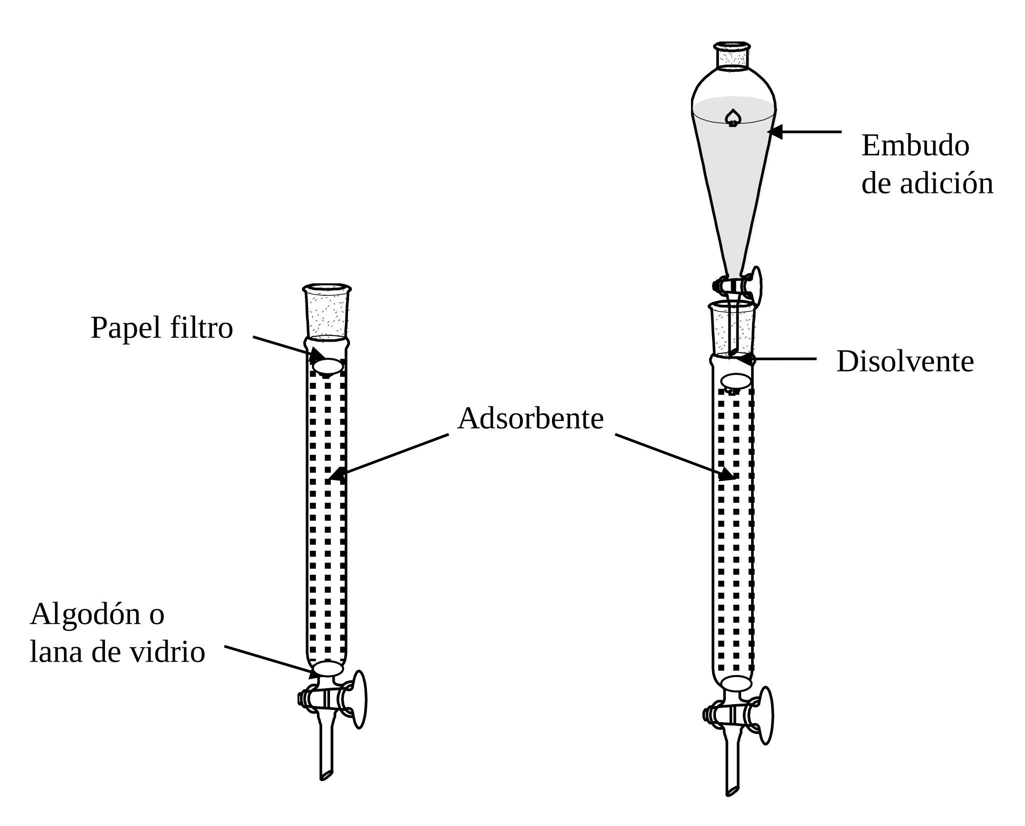
En esta técnica cromatográfica las mezclas se resuelven (separan) pasando una fase líquida móvil (eluyente) a través de la fase estacionaria sólida empacada en una columna de vidrio.

En la CC clásica el sistema más empleado es el de adsorción; como las fuerzas de atracción son diferentes para los distintos componentes de la mezcla, estos fluyen de arriba hacia abajo con velocidades diferentes, los menos atraídos por la fase estacionaria eluyen primero.

El tamaño de la columna depende de la cantidad de la muestra que se va a separar y el grado de resolución (distancias entre las manchas de los componentes). Suelen usarse razones de 30:1 de peso de adsorbente: peso muestra.

En el extremo inferior de la columna se introduce un pequeño tapón de algodón o lana de vidrio, sobre el tapón de algodón se puede colocar una cantidad pequeña de arena limpia y fina (no es absolutamente necesario). Luego el adsorbente debe empacarse uniformemente en la columna de vidrio sin que queden orificios o grietas (para esto se golpea la columna con un lápiz o un trozo de manguera). Existen varios procedimientos

para llenar satisfactoriamente las columnas cromatográficas; un procedimiento consiste en llenar la columna con el disolvente (fase móvil) y agregar sobre éste poco a poco el adsorbente, golpeando continuamente la columna; la adición se interrumpe cuando se ha alcanzado la altura adecuada. Otro método húmedo consiste en la preparación de una "lechada" con el disolvente y el adsorbente; en la columna se pone un poco de disolvente y la lechada se vierte sobre éste, dejando después que el adsorbente se sedimente. Si la columna tiene una llave en la parte inferior, se deja un poco abierta durante el proceso de sedimentación. El flujo lento de disolvente ayuda a la formación de una columna uniforme.




**Montaje de una columna cromatográfica**

Después puede colocarse en el tope una mota de algodón o un disco de papel filtro. Cuando el disolvente alcance el borde superior de la fase estacionaria se adiciona la solución de los componentes a separar (la mezcla a separar se disuelve en el mínimo volumen del disolvente o eluyente), hasta que la mezcla a separar se introduzca en su totalidad en la fase estacionaria, seguido por la adición lenta (por la parte superior de la columna), de pequeños volúmenes (0.5 mL aprox.) del eluyente. Una vez toda la muestra se encuentre dentro la fase estacionaria se puede adicionar el eluyente hasta alcanzar 0.5 cm por debajo del borde superior de la columna si es necesario.

Como la mayoría de los compuestos orgánicos son incoloros, se colectan fracciones sucesivas en diferentes tubos de ensayo, cada una aproximadamente con un volumen del 5 al 10% del volumen total de la columna. Con CCD se analiza cada una de las fracciones, las que sean iguales se unen, se evapora el disolvente quedando los compuestos separados. Para las técnicas de CCD y columna se usan frecuentemente sílica gel y alúmina como fase estacionaria. El orden de elusión para compuestos en sílica o alúmina es el inverso a la habilidad de los compuestos para enlazarse a la fase estacionaria.

La fuerza de atracción por parte de la fase estacionaria aumenta de la siguiente manera:

Sales > ácidos orgánicos > aminas > alcoholes > compuestos cabonílicos > arenos > haluros de alquilo > éteres > alquenos > alcanos.

El éxito de las técnicas de cromatografía de capa delgada y columna depende de la selección de la fase móvil, la que a su vez depende principalmente de la naturaleza del compuesto que se va a separar. La fuerza del disolvente (o poder de elusión) aumenta con su polaridad. A continuación se suministra una serie de disolventes (fase móvil), conocida cono serie eluotrópica utilizada en CCD y cromatografía de columna.

| **Disolvente** | **Pto. Ebullición (ºC)** | **Constante dieléctrica** |
|---|---|---|
| n-Hexano | 69 | 1.8 |
| Ciclohexano | 81 | 2.0 |
| Tetracloruro de carbono | 77 | 2.2 |
| Benceno | 80 | 2.3 |
| Tolueno | 110 | 3.9 |
| Éter etílico | 35 | 4.3 |
| Cloroformo | 61 | 4.8 |
| Acetato de etilo | 77 | 6.0 |
| Diclorometano | 40 | 8.9 |
| Etanol | 78 | 24.6 |
| Metanol | 65 | 32.7 |
| Agua | 100 | 80.0 |

Para el desarrollo de la cromatografía puede utilizarse un disolvente o una mezcla de dos disolventes como fase móvil.

En esta práctica se desarrollará el cromatograma (separación) de una mezcla de tintes.

## MATERIAL Y REACTIVOS

| | |
|---|---|
| 1 Columna de cromatografía | Algodón |
| 1 Gotero de vidrio | Sílica gel 70-230 Mesh |
| 1 Trozo de manguera | Arena |
| 2 Beakers de 20 mL | Papel filtro |
| 2 Vidrios de reloj | Mezcla de tintes |
| 2 Placas (2x5 cm) de cromatografía de capa delgada (Sílica gel) | Etanol |
| 1 Embudo pequeño de caña larga | Ácido acético al 50% |
| 8 Tubos de ensayo | 1 Gradilla |
| 1 Pinza para placa de capa delgada | 1 Varilla de vidrio |

## NORMAS DE SEGURIDAD

## ALCOHOL ETÍLICO

Compuesto extremadamente inflamable, se deben evitar las llamas, NO producir chispas, NO poner en contacto con superficies calientes y NO fumar. Las mezclas vapor/aire son explosivas. En caso de inhalación produce tos, somnolencia, dolor de cabeza, fatiga. Proporcionar ventilación, aire limpio, reposo. En contacto con la piel y los ojos produce enrojecimiento, dolor, sensación de quemazón. Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad) y proporcionar asistencia médica. En caso de ingestión produce sensación de quemazón, confusión, vértigo, dolor de cabeza, pérdida del conocimiento. Enjuagar la boca y proporcionar asistencia médica.

## PROCEDIMIENTO

**Cromatografía de columna**: se introduce en la columna una motita de algodón y se ubica en el extremo inferior, luego se adiciona sílica gel hasta una altura aproximada de 4 cm. Se coloca una capita fina de arena (o una motita de algodón) en la parte superior de la sílica. Se golpea suavemente la columna para que la fase estacionaria se acomode, sin dejar espacios vacíos.

Se ajusta la altura para que debajo se pueda alinear una serie de 4 tubos de ensayo colocados en la gradilla. Estos servirán para recoger las fracciones. Se rotulan #1, #2, #3 y #4. Se añade, con un gotero, suficiente etanol para que se humedezca toda la columna. Se golpea otra vez para lograr que se eliminen burbujas de aire y quede bien compacta la fase estacionaria. Se permite que empiece un goteo moderado de disolvente y se recoge éste en el tubo de ensayo #1. Durante este proceso, se sigue añadiendo disolvente para que la columna no se seque y se parta (se llene de aire).

Cuando el disolvente se encuentra 2-3 mm por encima de la fase estacionaria, se añade tres gotas de la mezcla de tintes, se adiciona etanol poco a poco hasta que la mezcla se introduzca en la fase estacionaria, luego se agrega etanol hasta casi llenar la columna de vidrio, se recoge la primera fracción en el tubo de ensayo #2 hasta que el disolvente sea prácticamente incoloro (para notar esto mejor, se coloca un papel blanco detrás de la columna para ver el color de las gotas que van cayendo).

Se cambia entonces al tubo de ensayo #3 y el disolvente a una mezcla agua:ácido acético (50:50) sin dejar secar la columna. Se añade suficiente mezcla para remover toda la fracción de color azul claro hasta que empiece a recoger gotas incoloras. Se cambia ahora al tubo de ensayo #4 y se recoge la fracción del último tinte. Mida el volumen de cada fracción y anote su color.

**Cromatografía de capa delgada:** Se toman 2 beakers de 20 mL (con 2 vidrios reloj como tapas, ver la figura 1) para ser usados como cámaras para desarrollar el cromatograma. Se rotulan #1 y #2. Los disolventes de elusión en cada uno serán como sigue:

| **Beaker** | **Disolvente (etanol-agua)** |
|---|---|
| #1 | etanol |
| #2 | mezcla 50:50 $H_2O$:ácido acético |

Reciba de su instructor 2 placas para cromatografía de capa delgada. Trazar a cada una con lápiz, una línea horizontal en la parte superior y otra en la parte inferior de la placa, aproximadamente, a 0.5 cm de cada borde. Se coloca en un extremo de cada placa (#1 y #2) un punto de la mezcla original de tintes (suministrada por el instructor). En el otro extremo de la placa #1 se coloca un punto de la solución del primer tinte que eluyó de la cromatografía de columna y en el otro extremo de la placa #2 un punto de la solución del segundo tinte en eluir de la cromatografía de columna. Los puntos deben colocarse aproximadamente a 0.5 cm del borde inferior de la placa (como se muestra en la imagen 3 de la Figura 1). Para esto, se sumerge un capilar bien fino en la mezcla de tintes y se toca levemente la superficie de cada placa para transferir una pequeña cantidad de mezcla a cada placa. La mancha que se forma no debe ser más grande que la cabeza de un alfiler. Con capilares diferentes haga lo mismo con las soluciones de los tubos #2 y #4, para las placas #1 y #2, respectivamente.

**Desarrollo de la CCD:** Para ello se coloca dentro de cada beaker (#1 y #2) una tira de papel filtro que abarque desde la base hasta la parte superior y todo el rededor del beaker; luego se adiciona una pequeña cantidad del disolvente correspondiente para la elusión (fase móvil). Humedezca completamente el borde inferior de la tira de papel y permita que el disolvente ascienda hasta la parte superior por capilaridad. Posteriormente, introduzca (con la ayuda de una pinza) cada una de las placas #1 y #2, previamente preparadas, en los beakers #1 y #2, respectivamente. El nivel del disolvente (eluyente) debe quedar por debajo de las manchas aplicadas. Permita que por capilaridad el eluyente ascienda a través de la placa hasta la línea horizontal superior previamente trazada. Con la pinza remueva la placa y colóquela con la cara hacia arriba sobre un vidrio de reloj o un trozo de papel hasta que el solvente se haya evaporado completamente.

Calcule el $R_f$ para cada mancha en las dos placas. Cuál sistema de disolventes es mejor para separar la mezcla de tintes?

## RECOMENDACIONES

Para golpear la columna durante su empaquetamiento, utilice una varilla de vidrio forrada con caucho u otro material que no la vaya a romper.

Los pares de tintes que pueden utilizarse para esta práctica son: fluoresceína y azul de metileno; naranja de metilo y azul de metileno o naranja de metilo y azul victoria B. trabaje con 1 mg de cada tinte, disuélvalos en etanol al 95%.

En muchas ocasiones se recomienda utilizar lana de vidrio en lugar de algodón, debido a que algunos componentes tiñen el algodón (retienen el tinte) obstaculizando una buena separación.

## PREGUNTAS

1. Explique por qué y cómo se separan los compuestos de la mezcla de tintes?

2. Qué es la cromatografía de columna seca? y cómo se desarrolla?

3. Cuál es el desarrollo múltiple y el desarrollo bidimensional de la CCD?

4. En qué consiste la cromatografía de CCD preparativa?

5. Qué es una resina de intercambio iónico?. Qué tipos existen y en qué se diferencian?.

6. Indique algunas de las aplicaciones de la cromatografía de adsorción en columna.